4 月 April
2020, 63(4): 401 - 412

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http: // www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2020.04.003

# 小麦吸浆虫保幼激素酯酶和保幼激素环氧水解酶基因的克隆及在滞育和变态发育过程中的表达动态

王晶晶[1], 梁婷婷[1], 成卫宁[1,*], 朱克岩[2]

(1. 西北农林科技大学, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西杨凌 712100;
2. Department of Entomology, Texas A&M University, Texas 77843, USA)

**摘要:**【目的】保幼激素(juvenile hormone, JH)在小麦吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 滞育诱导及滞育后静息状态的维持中发挥着重要作用。保幼激素酯酶(hormone esterase, JHE)和保幼激素环氧水解酶(juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)是调控 JH 滴度的重要降解酶。本研究旨在探讨 *JHE* 和 *JHEH* 在小麦吸浆虫滞育和变态发育中潜在功能。【方法】通过 RT-PCR 和 RACE 技术从小麦吸浆虫滞育前幼虫克隆 *JHE* 和 *JHEH* 全长 cDNA 序列;利用生物信息学软件分析其核苷酸及编码蛋白特性;采用 qPCR 技术分析其在小麦吸浆虫滞育不同时期(滞育前、滞育期、滞育后静息期和滞育后发育)3 龄幼虫及 1 龄幼虫到成虫不同发育阶段(1 - 2 龄幼虫、预蛹、初蛹、中蛹、后蛹、雌成虫和雄成虫)中的表达水平。【结果】克隆获得了 cDNA 全长分别为 3 102 和 1 980 bp 的小麦吸浆虫 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 基因(GenBank 登录号分别为 MG876768 和 MG876769),其开放阅读框分别长 1 740 和 1 371 bp,分别编码 579 和 456 个氨基酸,预测蛋白分子量分别为 65.67 和 51.65 kD。SmJHE 蛋白含有 5 个 JHE 家族特有的保守模块,SmJHEH 含有催化三联体 Asp228, Asp404 和 His431 及组成阴氧离子洞的两个 Tyr(Tyr299 和 Tyr374)和 HGWP 花样结构。序列比对和进化分析表明,SmJHE 和 SmJHEH 均与双翅目(Diptera)长角亚目(Nematocera)昆虫同源蛋白氨基酸序列一致性较高,亲缘关系最近。不同滞育时期的表达模式表明,*SmJHE* 和 *SmJHEH* 在滞育前期(1 龄到滞育前的 3 龄幼虫早期)表达量变化不明显,进入滞育后表达量基本维持恒定,但均在滞育后静息阶段的当年 12 月至翌年 1 月最低。发育表达模式表明,幼虫恢复发育后 *SmJHE* 表达量逐渐升高,预蛹期达到最高,在雌成虫中的表达量显著低于雄成虫中的;*SmJHEH* 表达量则在预蛹期最低,在雌成虫中最高。【结论】*SmJHE* 和 *SmJHEH* 参与小麦吸浆虫滞育调控,其表达量的降低与滞育后静息阶段 JH 的累积有关;*SmJHE* 在发育过程中表达量的升高可能参与幼虫到蛹的变态,表达量的降低可能与生殖发育有关。

**关键词:** 小麦吸浆虫; 保幼激素酯酶; 保幼激素环氧水解酶; 基因克隆; 滞育; 变态; 发育

**中图分类号:** Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)04-0401-12

# Cloning of juvenile hormone esterase and juvenile hormone epoxide hydrolase genes and their expression dynamics during diapause and metamorphosis in *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae)

WANG Jing-Jing[1], LIANG Ting-Ting[1], CHENG Wei-Ning[1,*], ZHU Ke-Yan[2] (1. Key Laboratory of

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371933); 国家重点研发计划(2018YFD020040302); 杨凌示范区科技计划项目(2018NY-07)

作者简介: 王晶晶, 女, 1996 年 2 月生, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为害虫综合治理, E-mail: 15271840466@163.com

[*] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cwning@126.com

收稿日期 Received: 2019-10-22; 接受日期 Accepted: 2020-01-16

Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Department of Entomology, Texas A&M University, Texas 77843, USA)

**Abstract**:【Aim】Juvenile hormone (JH) plays important roles in diapause induction, maintenance and post-diapause quiescence of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana*, an insect species undergoing obligatory larval diapause. Juvenile hormone esterase (JHE) and juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) are important JH degradation enzymes that play key roles in regulating insect JH titers. This study aims to explore the potential roles of *JHE* and *JHEH* in the diapause and metamorphosis of *S. mosellana*.【Methods】The full-length cDNAs of *JHE* and *JHEH* were cloned from pre-diapause larvae of *S. mosellana* by RT-PCR and RACE technologies. The sequence characteristics of nucleotide and amino acid sequences of the cloned *JHE* and *JHEH* were analyzed by bioinformatics software. The expression levels of *JHE* and *JHEH* in the 3rd instar larvae of *S. mosellana* at different diapause stages (pre-diapause, diapause, post-diapause quiescent and post-diapause development) and different developmental stages from the 1st instar larva to adult (the 1st-2nd instar larva, pre-pupa, early pupa, middle pupa, late pupa, male adult and female adult) were determined by qPCR.【Results】The full-length cDNA sequences of *JHE* and *JHEH* were obtained from *S. mosellana* and named *SmJHE* and *SmJHEH* (GenBank accession number: MG876768 and MG876769, respectively), with the length of 3 102 and 1 980 bp, respectively. *SmJHE* and *SmJHEH* contain 1 740 and 1 371 bp ORFs, respectively, which encode the proteins of 579 and 456 amino acids with the predicted molecular weights of 65.67 and 51.65 kD, respectively. SmJHE contains five specific conserved motifs of JHE protein family, and all of the conserved domains of JHEHs including the residues Asp228, Asp404 and His431 in the catalytic triad, and two Tyr residues (Tyr299 and Tyr374) and the HGWP motif corresponding to the oxyanion hole. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that SmJHE and SmJHEH have higher amino acid sequence identity and the closest relationship to the corresponding homologues from Nematocera insects of Diptera. The expression levels of *SmJHE* and *SmJHEH* showed no significant change at the pre-diapause stage (the 1st, 2nd and early 3rd instar larval stages), remained stable after entering diapause, but were the lowest at the post-diapause quiescence phase (from December to the next January). The expression of *SmJHE* increased gradually after development resumption, reached the peak in the pre-pupal stage, and was significantly lower in female adults than in male adults. The expression of *SmJHEH*, however, reached the highest in female adults and the lowest in pre-pupae.【Conclusion】*SmJHE* and *SmJHEH* are involved in diapause of *S. mosellana*. Their reduced expression during diapause might be related to accumulation of JH titers in post-diapause quiescence. Increased expression of *SmJHE* during the development process of *S. mosellana* might play a role in metamorphosis from larva to pupa, and its reduced expression might be related to reproductive development.

**Key words**: *Sitodiplosis mosellana*; juvenile hormone esterase; juvenile hormone epoxide hydrolase; gene cloning; diapause; metamorphosis; development

保幼激素(juvenile hormone, JH)是最重要的一类昆虫激素,不仅具有调控昆虫发育和翅型分化(Ayoade *et al*., 1999; Zhao *et al*., 2017)、阻止幼虫变态(Riddiford *et al*., 2010; Jindra *et al*., 2013)、促进卵子成熟等功能(Riddiford, 2012; Roy *et al*., 2018),对滞育也具有重要的调节作用。滞育是昆虫抵御不良环境,延续种族发展的重要生态对策。大量研究表明,不仅海藻糖、山梨醇、甘油三酯等化学物质在昆虫滞育前后发生变化(朱芬等, 2008; 刘洋等, 2016),与滞育维持和滞育后的发育恢复相关, JH 在幼虫滞育的诱导和维持(Yin and Chippendale, 1973; Yagi and Akaike, 1976; Sieber and Benz, 1977; Eizaguirre *et al*., 1998, 2005; Munyiri and Ishikawa, 2004; Jiang *et al*., 2011)以及

成虫滞育的终止过程中也发挥重要作用（Vermunt *et al.*, 1997；Smykal *et al.*, 2014；Liu *et al.*, 2016）。

昆虫血淋巴中 JH 的滴度是通过合成与代谢共同维持和平衡的（李胜等，2004），其滴度的精确调控对发挥其功能至关重要。已知的两条 JH 代谢途径分别由保幼激素酯酶（juvenile hormone esterase，JHE）和保幼激素环氧水解酶（juvenile hormone epoxide hydrolase，JHEH）催化。其中 JHE 被认为是大多数昆虫中最主要的代谢酶，该酶属于羧酸酯酶（carboxylesterases，COEs）家族，主要分布在昆虫的血淋巴、中肠和脂肪体中，能够高度识别并分解与保幼激素结合蛋白结合的或游离的 JH 为保幼激素酸，促进或抑制其活性能扰乱昆虫体内的 JH 水平，影响昆虫蜕皮、化蛹和生殖，使昆虫发育紊乱，丧失生活能力或降低生殖力（Wogulis *et al.*, 2006；杨文佳等，2010；EI-Sheikh *et al.*, 2016），从而达到间接杀虫的目的。最近研究发现，在一些昆虫 JH 代谢中，JHEH 与 JHE 同时发挥作用，甚至比 JHE 更重要。例如，在烟草天蛾 *Manduca sexta* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的幼虫阶段以及褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的翅型分化中，JHEH 的降解是 JH 代谢的主要途径（Halarnkar *et al.*, 1993；Tsubota *et al.*, 2010；Zhao *et al.*, 2017）。

小麦吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 是我国乃至世界小麦生产上最重要的害虫（Miao *et al.*, 2013；Shrestha and Reddy，2019）。该虫一年发生 1 代，每年 4 月小麦抽穗后成虫盛发并产卵，幼虫孵化后危害正在发育的籽粒，小麦黄熟后 3 龄老熟幼虫脱离麦穗落入土中，在土壤中结茧进入滞育，直至 12 月后大部分个体终止滞育并进入滞育后静息期，翌年 3 月小麦拔节后才恢复发育（王越等，2015；Cheng *et al.*, 2017），即以滞育状态存在长达 10 个月，属典型的专性幼虫滞育昆虫。前期研究表明，JH 在小麦吸浆虫滞育诱导、维持及滞育后静息状态维持中发挥重要作用（Cheng *et al.*, 2020），但其滴度的代谢调控是由 JHE 还是 JHEH 或者二者共同作用尚不清楚。为探讨小麦吸浆虫滞育和变态发育过程中 JH 滴度的代谢调控机理，本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆小麦吸浆虫 *JHE* 和 *JHEH* 基因，并利用 qPCR 技术检测两个基因在滞育和发育进程的表达模式，为明确 JH 调控因子在小麦吸浆虫生命活动中的功能及利用其打破体内 JH 代谢平衡控制危害提供参考。

## 1　材料与方法

### 1.1　供试昆虫

供试昆虫为小麦吸浆虫生活史中除卵外的所有发育阶段，获得方法如下：2016 年 5 月上旬，在陕西省周至县小麦吸浆虫发生严重的麦田采集正在灌浆的感虫麦穗，在解剖镜下剥穗分离 1 和 2 龄幼虫，虫龄依据虫体大小、颜色和 Y 型剑骨片区分（Gagne and Doane，1999）；2016 年 5 月下旬大量采集被害麦穗，保存部分 3 龄麦穗幼虫作为滞育前样本，其余放入西北农林科技大学校内养虫圃（34°16′N，108°4′E），让老熟幼虫自然落土进入滞育，然后于入土后 1 个月至翌年 2 月，每月淘土采集结茧幼虫，翌年 3 月幼虫破茧恢复活动后至 4 月上旬采集滞育后发育幼虫，随后依次采集预蛹、初蛹、中蛹、后蛹及雌雄成虫，蛹发育程度依据复眼和翅芽颜色划分（武予清等，2011）。样本收集后每 50（1－2 龄幼虫）或 20 头（1－2 龄外的其他虫态）分装于 1.5 mL 离心管，液氮快速冷冻后 －80℃ 保存备用。

### 1.2　小麦吸浆虫 *JHE* 和 *JHEH* 基因 cDNA 全长序列的克隆

取 20 头小麦吸浆虫滞育前幼虫，参考 RNA Simple Total RNA Kit 试剂盒（TIANGEN，北京）操作说明提取总 RNA，用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪检测后，以 1 μg 总 RNA 为模板，按照 PrimeScript$^{\text{TM}}$ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒（TaKaRa，大连）说明书操作，反转录获得 cDNA 第 1 链。

根据前期获得的小麦吸浆虫幼虫转录组中 *JHE* 和 *JHEH* 基因保守区片段，利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物（表 1）。以获得的 cDNA 为模板，根据 2 × Taq Master Mix 试剂盒（康为世纪，北京）扩增目的片段，PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测后，用 DNA 纯化回收试剂盒（TIANGEN，北京）纯化，然后与 pMD$^{\text{TM}}$-19T 克隆载体连接，转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞，接种到含 Ampicillin，IPTG 和 X-Gal 的培养基培养。经蓝白斑筛选后，挑取白色菌落扩大培养，最后将鉴定的阳性克隆菌液送往上海英俊公司进行测序，每个基因测定 3 个阳性克隆。

根据以上获得的 *JHE* 和 *JHEH* 基因保守区片段序列设计 5′和 3′ RACE 引物（表 1）。RACE-PCR 扩增反应按照 3′ Full RACE Core Set with

PrimerScript$^{\text{TM}}$ RTase 和 5′ Full RACE Kit with TAP (TaKaRa, 大连)试剂盒操说明进行。其中 5′RACE Outer 和 Inner 扩增程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 40 s，54℃退火 40 s，72℃延伸 40 s，32 个循环；72℃延伸 7 min。3′RACE Outer 扩增程序：94℃ 3 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 90 s，25 个循环；72℃ 10 min；Inner 扩增程序同 Outer PCR(除循环数为 35 外)。PCR 产物按照上述步骤经过电泳检测、连接、转化和测序验证后，应用 DNAMAN 6.0 软件将获得的中间序列及 5′和 3′末端序列进行组装，然后根据拼接序列设计引物(表 1)进行 PCR 扩增。反应体系(25 μL)：2 × Taq MasterMix 12.5 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，cDNA 模板 1.5 μL，ddH$_2$O 9 μL。扩增程序：94℃预变性 7 min；94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，35 个循环；72℃ 终延伸 5 min。反应结束后对扩增产物进行克隆和测序验证。

### 1.3 序列分析和系统树构建

利用 ORF Finder 在线工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)对克隆获得的小麦吸浆虫 *JHE* 和 *JHEH* 基因进行开放阅读框鉴定；编码蛋白的分子量和等电点应用 ExPASy 数据库(http://www.expasy.org/Protparam)进行预测，使用 SignalP 5.0 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)进行信号肽预测，根据已报道昆虫 JHE (Ward *et al*., 1992；Kamita and Hammock, 2010)和 JHEH 序列(Zhang *et al*., 2005)推导目标蛋白特异保守模块；氨基酸序列一致性分析采用 Blastp 软件(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)。使用 MEGA 6.0 软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ method)，进行 1 000 次 bootstrap 构建系统发育进化树。

### 1.4 小麦吸浆虫 *JHE* 和 *JHEH* 基因在滞育和变态发育进程中的 mRNA 表达分析

按照 1.2 节中方法分别提取小麦吸浆虫滞育不同时期 3 龄幼虫及不同发育阶段(1 - 2 龄幼虫、预蛹、初蛹、中蛹和后蛹以及雌雄成虫)样本总 RNA，并反转录成 cDNA，其中 1 龄和 2 龄幼虫每处理分别用 200 和 100 头试虫，其他各阶段为 20 头。每处理重复 3 次。

以合成的 cDNA 为模板，按照 SYBR Premix EX Taq$^{\text{TM}}$ II (TaKaRa, 大连)试剂盒说明书，在 ABI7500

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物 Primer | 引物序列 Primer sequences (5′ - 3′) | 用途 Use |
|---|---|---|
| SmJHE-F | CTGAAGTGGTGGGCATTG | 中间片段扩增<br>Amplification of intermediate fragment |
| SmJHE-R | TCGGAATCGGCAGTGAGT | |
| SmJHEH-F | TTCGCACCGTTACCACCAC | |
| SmJHEH-R | CCGCATACAAACGCATCG | |
| SmJHE-3′-outer | GGTGAGATTCTGGGATG | 3′RACE |
| SmJHE-3′-inner | GTTAAGCGAGACTGGAA | |
| SmJHEH-3′-outer | CTACCTTACCAATAGTATAACGACG | |
| SmJHEH-3′-inner | TGAACATTACCCAATAGAC | |
| SmJHE-5′-outer | TGGCCCACGGAAAAGCGTATGAATC | 5′RACE |
| SmJHE-5′-inner | TTTTCTTGGACGATGTATTAGTGGG | |
| SmJHEH-5′-outer | ATTATAAACAACTGTAACGTGCCGC | |
| SmJHEH-5′-inner | AGGCAAGCAGGCTATATTCGAGAAC | |
| SmJHE-all-F | AATTGTTGTTATTCTGCTGTT | 全长验证<br>Full-length validation |
| SmJHE-all-R | GACGAATTCTAATTAAAGACGAATC | |
| SmJHEH-all-F | ACATTTCTGATAGTCCATTGA | |
| SmJHEH-all-R | ATTGAACATTACCCAATAAAC | |
| SmJHE-q-F | GGCGCATTCAAACAAGTT | qPCR |
| SmJHE-q-R | TCGGTTAGAATAGCGGCT | |
| SmJHEH-q-F | TGAACAAAGCAAAGGATG | |
| SmJHEH-q-R | TCAGTTGGATTCAAGCCT | |
| SmGAPDH-q-F | CCATCAAAGCAAGCAAGA | |
| SmGAPDH-q-R | CAGCACGGAGCACAAGAC | |

实时荧光定量PCR系统上检测*JHE*和*JHEH*基因在不同滞育和发育阶段样本中 mRNA 的转录水平。*JHE* 和 *JHEH* 及内参基因 *GAPDH*（GenBank 登录号：KR733066）定量引物见表 1。qPCR 反应体系（20 μL）：2 × SYBR Green Premix EX Taq$^{\text{TM}}$ II 10 μL，cDNA 模板 2.0 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.8 μL，50 × ROX Reference Dye 0.4 μL，其余为超纯水。扩增程序：95℃ 预变性 30 s；95℃ 变性 5 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，共 40 个循环。反应结束后读取 Ct 值，每样品重复测定 3 次。

### 1.5　数据分析

分别以小麦吸浆虫滞育前的 3 龄幼虫和 1 龄幼虫中的基因表达量为基准，对 1.4 节获得的数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算不同滞育和发育阶段 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 基因相对表达水平。采用 SPSS 22.0 统计软件（Chicago，IL.，美国）对数据进行单因素方差分析（$P < 0.05$），Tukey 氏法进行多重比较。

## 2　结果

### 2.1　小麦吸浆虫 *JHE* 和 *JHEH* 基因的克隆与序列分析

以小麦吸浆虫转录组中 *JHE* 和 *JHEH* 序列设计特异引物，通过 RT-PCR 和 RACE 技术，成功获得了 cDNA 全长分别为 3 102 和 1 980 bp 的小麦吸浆虫 *JHE* 基因（*SmJHE*）（GenBank 登录号：MG876768）和 *JHEH* 基因（*SmJHEH*）（GenBank 登录号：MG876769）（图 1）。ORF Finder 预测显示，*SmJHE* 和 *SmJHEH* 的 ORF 长度分别为 1 740 bp 和 1 371 bp，分别编码 579 和 456 个氨基酸残基，预测的蛋白分子量分别为 65.67 和 51.65 kD，理论等电点分别为 5.76 和 8.66。两个基因的起始密码子均为 atg，分别位于第 733 – 735 bp 和 291 – 293 bp 处；终止密码子均为 taa，分别位于第 2 472 – 2 474 bp 和 1 661 – 1 663 bp处；3′非编码区均具有真核生物典型的多聚腺甘酸信号（aataa）和 PolyA 结构。

SignalP5.0 软件分析发现，*SmJHE* 和 *SmJHEH* 基因推导的氨基酸序列 N 末端分别存在一个长度为 22 和 18 个氨基酸残基组成的信号肽序列（图 1）。氨基酸序列（图 1）分析发现，SmJHE 蛋白包含昆虫保幼激素酯酶 5 个典型功能基序，即一个长疏水结合域 GxSxG，是 COEs 的关键组成部分；其他 4 个基序分别为 RF（第 67 – 68 位氨基酸）、DQ（第 187 – 188 位氨基酸）、E（第 347 位氨基酸）和 GxxHxxE（第 466 – 472 位氨基酸）；其中 S215，E347 和 H469 被预测形成催化三联体（Ward *et al.*，1992；Kamita and Hammock，2010）。SmJHEH 蛋白包含 JHEH 家族组成阴氧离子洞的两个 Tyr299 和 Tyr374 残基和 HGWP 花样结构（第 155 – 158 位氨基酸）以及形成催化三联体的氨基酸残基，但组成催化三联体的 1 个氨基酸发生了变异，即在多数昆虫 JHEH 中为 Asp，Glu 和 His（Zhang *et al.*，2005；Mackert *et al.*，2010），但 SmJHEH 中为 Asp228，Asp404 和 His431。赤拟谷盗 *T. castaneum*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等 JHE 也利用 Asp 替代 Glu 作为催化三联体（Tsubota *et al.*，2010；Lü *et al.*，2015）。

### 2.2　SmJHE 和 SmJHEH 蛋白序列一致性和系统进化分析

蛋白氨基酸序列一致性分析（图 2）表明，SmJHE 与同目同亚目（双翅目长角亚目）昆虫达氏按蚊 *Anopheles darling*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* JHE 的氨基酸序列一致性较高，为 49% ~ 51%，其次为与家蝇 *Musca domestica*、厩螯蝇 *Stomoxys calcitrans*、丝光绿蝇 *Lucilia cuprina*、牵牛花果蝇 *Drosophila elegans*、地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 和浆果实蝇 *Rhagoletis zephyria* 等同目短角亚目昆虫 JHE 的氨基酸序列一致性为 45% ~48%，与其他 3 个目（鳞翅目、膜翅目和鞘翅目）7 种昆虫同源蛋白的氨基酸序列一致性为 40% ~42%。SmJHEH 与 12 种双翅目昆虫 JHEH 的氨基酸序列一致性为 51% ~53%，与鳞翅目、膜翅目和鞘翅目 7 种昆虫 JHEH 的氨基酸序列一致性为 47% ~49%。用 MEGA 6.0 中的邻接法进行系统进化分析（图 2）发现，双翅目、鳞翅目、膜翅目和鞘翅目昆虫 JHE 和 JHEH 完全被分开，SmJHE 和 SmJHEH 均与长角亚目昆虫对应蛋白的亲缘关系最近，与昆虫传统分类结果一致。

### 2.3　小麦吸浆虫滞育不同阶段幼虫 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 表达水平分析

为探讨 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 在小麦吸浆虫滞育中可能的作用，采用 qPCR 技术分析了两个基因在 3 龄幼虫滞育前、滞育期、滞育后静息和发育恢复后不同阶段的 mRNA 表达水平。结果表明，二者在滞育进程中表达水平均存在显著差异（$P < 0.05$）。*SmJHE* 在滞育前和滞育期（2016 年 6 – 11 月）基本恒定，但 11 月即向滞育后的过度期和静息阶段的早

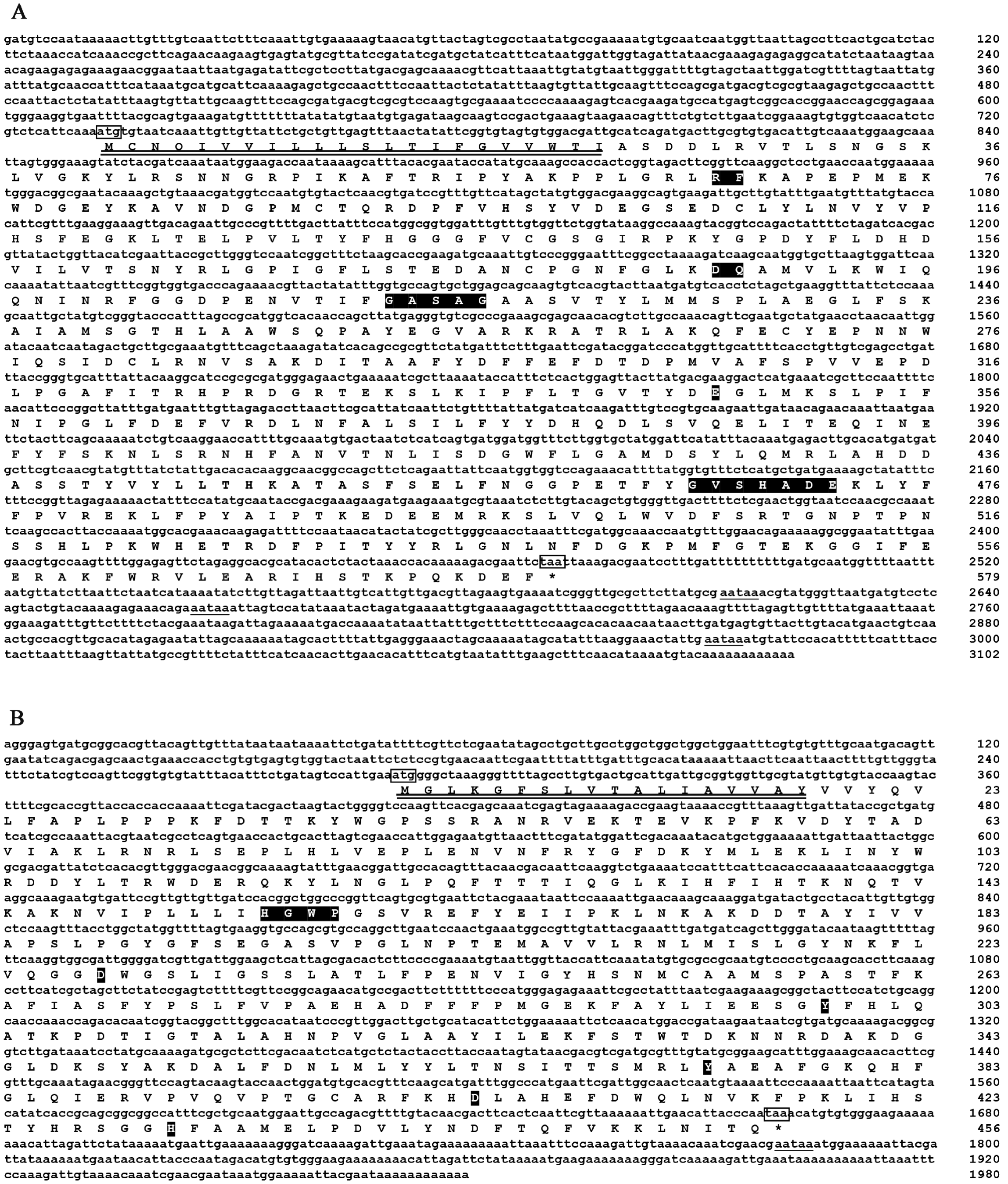

图 1 小麦吸浆虫 *SmJHE*（A）和 *SmJHEH*（B）核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SmJHE* (A) and *SmJHEH* (B) from *Sitodiplosis mosellana*

起始密码子 atg 和终止密码子 taa 用方框标注，N 端的信号肽用双下划线标注，多聚腺苷酸信号（aataa）用单下划线标注。JHE 的 5 个保守结构域 RF，DQ，GASAG，E 和 GVSHADE 和组成 JHEH 的催化三联体的 Asp228，Asp404 和 His431 氨基酸残基用及组成阴氧离子洞的 Tyr299 和 Tyr374 残基以及 HGWP 花样结构用黑色阴影标注。The initiation codon atg and the termination codon taa are boxed. The N terminal signal peptides are indicated by double underline. The putative polyadenylation signals (aataa) are indicated by single underline, and five conserved motifs of JHE including RF, DQ, GASAG, E and GVSHADE, as well as acidic residues consisting of the conserved catalytic triad including Asp228, Asp404 and His431, and the potenital oxyanion hole including Tyr299 and Tyr 374 and HGWP motif of JHEH are in black shade.

期（12 月）表达量最低，为滞育前的 46% ~61%，随后逐渐升高，恢复发育后达到最高，尤其发育的后期（2017 年 4 月），表达水平为滞育前的 4.58 倍，显著高于滞育前、滞育期和滞育后静息期（图 3：A）。

与 *SmJHE* 一样，整个滞育进程中，*SmJHEH* 在 2016 年 11 月和滞育后静息期表达水平低于其他时期。不同的是，*SmJHEH* 在翌年 1 月表达水平最低，为滞育前的 56%，发育恢复后表达量有升高，但随

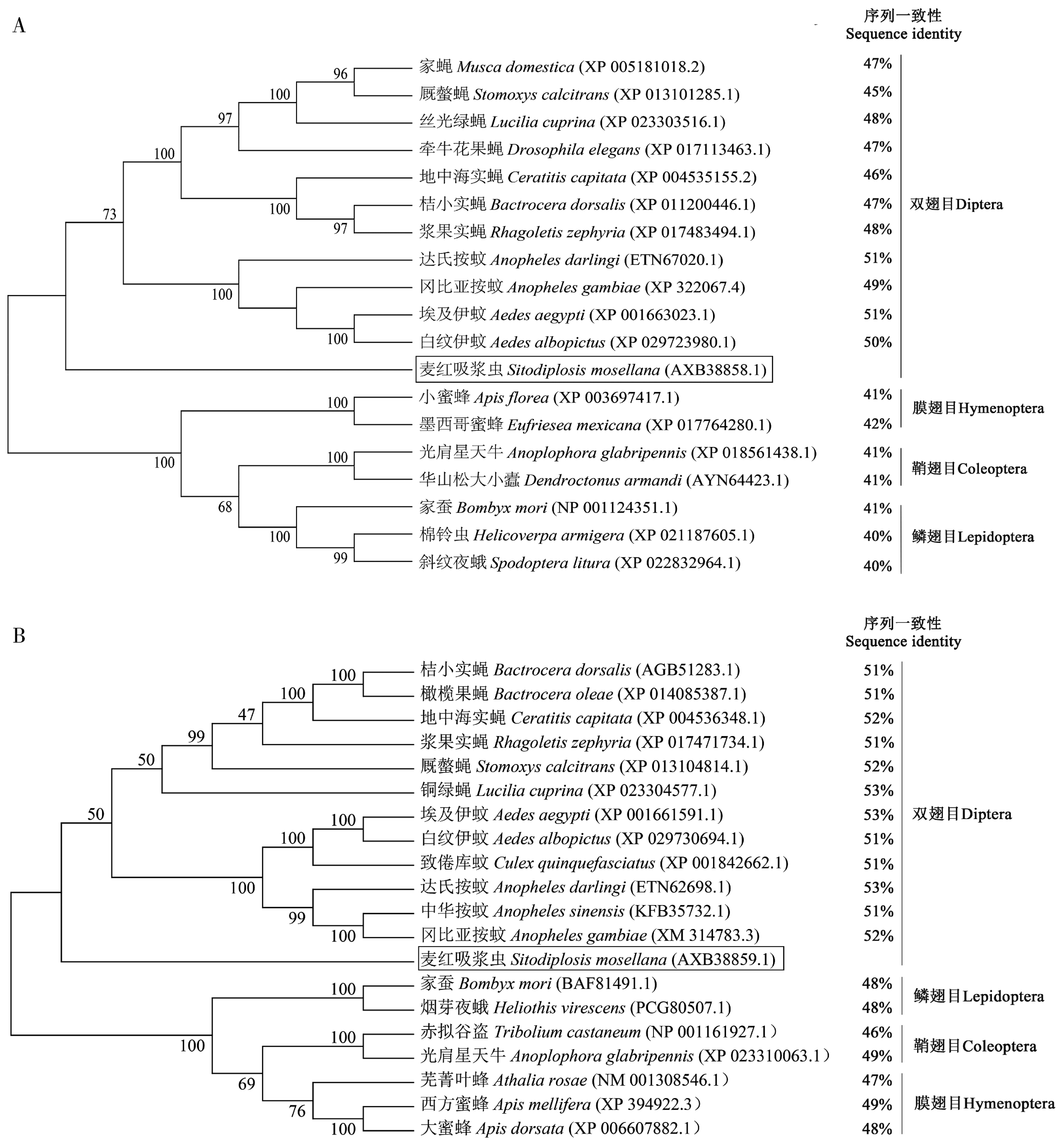
A
序列一致性
Sequence identity
家蝇 Musca domestica (XP 005181018.2) 47%
厩螫蝇 Stomoxys calcitrans (XP 013101285.1) 45%
丝光绿蝇 Lucilia cuprina (XP 023303516.1) 48%
牵牛花果蝇 Drosophila elegans (XP 017113463.1) 47%
地中海实蝇 Ceratitis capitata (XP 004535155.2) 46%
桔小实蝇 Bactrocera dorsalis (XP 011200446.1) 47%
浆果实蝇 Rhagoletis zephyria (XP 017483494.1) 48%
达氏按蚊 Anopheles darlingi (ETN67020.1) 51%
冈比亚按蚊 Anopheles gambiae (XP 322067.4) 49%
埃及伊蚊 Aedes aegypti (XP 001663023.1) 51%
白纹伊蚊 Aedes albopictus (XP 029723980.1) 50%
麦红吸浆虫 Sitodiplosis mosellana (AXB38858.1)
双翅目Diptera
小蜜蜂 Apis florea (XP 003697417.1) 41%
墨西哥蜜蜂 Eufriesea mexicana (XP 017764280.1) 42%
膜翅目Hymenoptera
光肩星天牛 Anoplophora glabripennis (XP 018561438.1) 41%
华山松大小蠹 Dendroctonus armandi (AYN64423.1) 41%
鞘翅目Coleoptera
家蚕 Bombyx mori (NP 001124351.1) 41%
棉铃虫 Helicoverpa armigera (XP 021187605.1) 40%
斜纹夜蛾 Spodoptera litura (XP 022832964.1) 40%
鳞翅目Lepidoptera
96
100
97
100
100
97
73
100
100
100
100
100
68
100
99
B
序列一致性
Sequence identity
桔小实蝇 Bactrocera dorsalis (AGB51283.1) 51%
橄榄果蝇 Bactrocera oleae (XP 014085387.1) 51%
地中海实蝇 Ceratitis capitata (XP 004536348.1) 52%
浆果实蝇 Rhagoletis zephyria (XP 017471734.1) 51%
厩螫蝇 Stomoxys calcitrans (XP 013104814.1) 52%
铜绿蝇 Lucilia cuprina (XP 023304577.1) 53%
埃及伊蚊 Aedes aegypti (XP 001661591.1) 53%
白纹伊蚊 Aedes albopictus (XP 029730694.1) 51%
致倦库蚊 Culex quinquefasciatus (XP 001842662.1) 51%
达氏按蚊 Anopheles darlingi (ETN62698.1) 53%
中华按蚊 Anopheles sinensis (KFB35732.1) 51%
冈比亚按蚊 Anopheles gambiae (XM 314783.3) 52%
麦红吸浆虫 Sitodiplosis mosellana (AXB38859.1)
双翅目Diptera
家蚕 Bombyx mori (BAF81491.1) 48%
烟芽夜蛾 Heliothis virescens (PCG80507.1) 48%
鳞翅目Lepidoptera
赤拟谷盗 Tribolium castaneum (NP 001161927.1) 46%
光肩星天牛 Anoplophora glabripennis (XP 023310063.1) 49%
鞘翅目Coleoptera
芜菁叶蜂 Athalia rosae (NM 001308546.1) 47%
西方蜜蜂 Apis mellifera (XP 394922.3) 49%
大蜜蜂 Apis dorsata (XP 006607882.1) 48%
膜翅目Hymenoptera
100
100
47
99
50
50
100
100
100
99
100
100
100
100
69
76
100

图 2　邻接法构建的基于氨基酸序列的小麦吸浆虫与其他昆虫 JHE（A）和 JHEH（B）的系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of JHE (A) and JHEH (B) from *Sitodiplosis mosellana* and other insects based on amino acid sequence by the neighbor-joining method

分支上的数字为 1 000 次重复的自举检验值。Numbers on the branches are the bootstrap values based on 1 000 replicates.

后又逐渐降低（图 3：B）。

## 2.4　小麦吸浆虫不同发育阶段 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 表达水平分析

由图 4 可知，小麦吸浆虫不同发育阶段 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 表达水平均存在差异显著（$P<0.05$）。*SmJHE* 在 1 龄到 3 龄幼虫早期表达水平较低且差异不显著（$P>0.05$），发育到 3 龄幼虫后期表达量显著升高，预蛹时达到最高，为 1 龄幼虫中的 8.6 倍，化蛹后表达水平显著下降，其中中蛹和后蛹中的表达量显著低于初蛹期的（$P<0.05$）；雄成虫中的表达水平与中、后蛹中的差异不显著（$P>0.05$），但显著高于雌成虫（$P<0.05$）（图 4：A）。

与 *SmJHE* 不同，整个发育过程中，*SmJHEH* 在预蛹期表达水平最低，仅为 1 龄幼虫中的 35%；在雌成虫中表达水平为在 1 龄幼虫中的 1.6 倍，显著高于雄成虫和其他所有虫态的表达水平（$P<0.05$）。幼虫期各阶段 *SmJHEH* 表达水平基本恒定，化蛹后表达水平逐渐升高，但各时期（初蛹、中

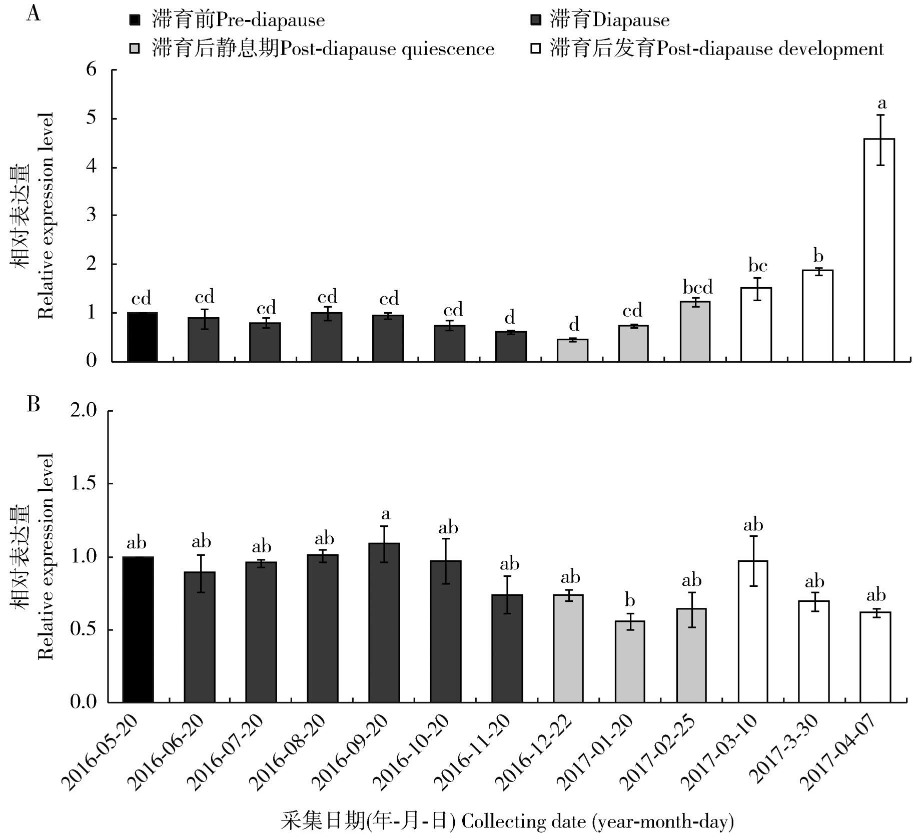

图 3　小麦吸浆虫滞育前后及滞育期 3 龄幼虫中 *SmJHE*（A）和 *SmJHEH*（B）的相对表达水平

Fig. 3　Relative expression levels of *SmJHE* (A) and *SmJHEH* (B) in the 3rd instar larvae of *Sitodiplosis mosellana* at the pre-diapause, diapause and post-diapause quiescence stages

图中数据为平均值 ± 标准误，柱上不同字母表示经 Tukey 氏多重比较后差异显著（$P<0.05$）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference by Tukey's multiple range test ($P<0.05$). 图 4 同 The same for Fig. 4.

蛹和后蛹）的表达水平差异未达显著水平（$P>0.05$）（图 4：B）。

## 3　讨论

JHE 和 JHEH 是在昆虫生命活动中调控 JH 滴度的重要降解酶（李胜等, 2004）。本研究克隆得到小麦吸浆虫 *SmJHE* 和 *SmJHEH* 基因全长 cDNA 序列，两个基因编码的蛋白不仅与已报道的同目长角亚目昆虫同源蛋白的氨基酸序列一致性较高，亲缘关系最近，而且与已报道的绝大多数昆虫 JHE 和 JHEH 一致（图 1 和 2），N 端包含一个由 18～22 个氨基酸组成的疏水性信号肽序列（徐素平等, 2014；Zhu *et al*., 2017）。研究表明，昆虫 JHEs 包含 RF, DQ, GxSxG, E 和 GxxHxxD/E 5 个保守结构域（Kamita and Hammock, 2010），其中 GxSxG 和 GxxHxxD/E 基序中的 S 和 H 以及 E 基序是最保守的，它们被预测形成催化三联体，而 RF 和 DQ 基序中的 R 和 D 残基是 JHE 发挥作用所必需的（Ward *et al*., 1992）。本研究结果显示 SmJHE 蛋白包含以上所有特征结构域，表明其在进化过程中功能高度保守，即在小麦吸浆虫体内 JH 的降解代谢中发挥作用。值得指出的是，SmJHE 基因编码的 GxSxG 模块为 GASAG，与绝大多数昆虫典型序列 GQSAG 相比第 2 位氨基酸发生了突变。类似现象也在西方蜜蜂 *Apis mellifera*（Mackert *et al*., 2008）、烟粉虱 *Bemisia tabaci*（龙楚云等, 2013）、大猿叶甲 *Colaphellus bowringi*（Zhu *et al*., 2017）等其他昆虫 JHEs 中发现。Mackert 等（2008）认为保守结构域的突变可能代表激素信号通路的调整，说明 JHE 在不同昆虫体内的作用途径可能存在差异。尽管大多数昆虫 JHEHs 组成催化三联体和阴氧离子洞的氨基酸残基高度保守（Zhang *et al*., 2005；Mackert *et al*., 2010），但小麦吸浆虫 SmJHEH 中构成催化三联体的氨基酸发生了小的变异，即 SmJHEH 中构成催化三联体的 Asp 在多数昆虫中为 Glu。类似现象也在

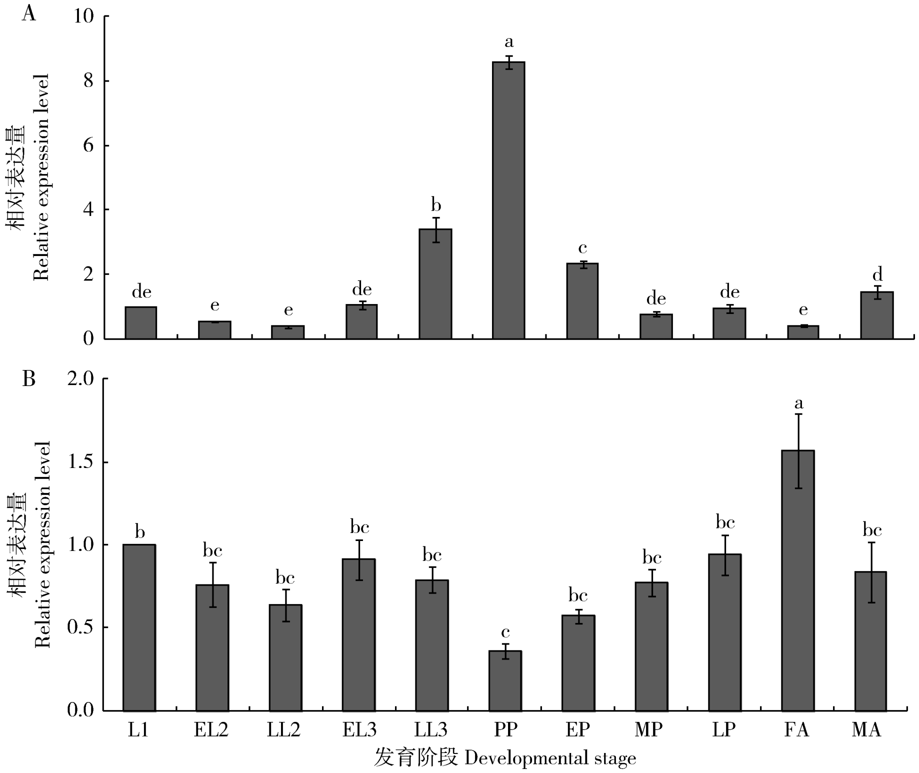

图 4　小麦吸浆虫不同发育阶段 *SmJHE*（A）和 *SmJHEH*（B）的相对表达水平

Fig. 4　Relative expression levels of *SmJHE*（A）and *SmJHEH*（B）at different developmental stages of *Sitodiplosis mosellana*

L1：1 龄幼虫 1st instar larva；EL2：2 龄幼虫早期 Early 2nd instar larva；LL2：2 龄幼虫后期 Late 2nd instar larva；EL3：3 龄幼虫早期 Early 3rd instar larva；LL3：3 龄幼虫后期 Late 3rd instar larva；PP：预蛹 Prepupa；EP：初蛹 Early pupa；MP：中蛹 Middle pupa；LP：后蛹 Late pupa；FA：雌成虫 Female adult；MA：雄成虫 Male adult.

赤拟谷盗 *T. castaneum*、马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 等 JHE 中发现，而且在赤拟谷盗 JHE 中也证明 Glu 突变为 Asp 后同样具有高效降解 JH 的能力（Tsubota *et al.*, 2010；Lü *et al.*, 2015），据此推测 SmJHEH 也具有该功能。

前期研究表明，JH 在小麦吸浆虫滞育诱导及滞育和滞育后静息状态的维持中发挥重要作用（Cheng *et al.*, 2020），据此推测，如果代谢途径在小麦吸浆虫滞育诱导期间 JH 滴度的调控中起主导作用，*SmJHE* 和 *SmJHEH* 在滞育前的 3 龄早期幼虫中的表达量应低于在 2 龄幼虫中的，且进入滞育后维持较低水平。事实上，黄斑星天牛 *Psacothea hilaris* 幼虫进入滞育后 JHE 活性显著降低且在滞育期间维持较低水平（Munyiri and Ishikawa, 2004）。然而与预期不同，*SmJHE* 和 *SmJHEH* 在 3 龄早期幼虫中的表达量与 1 和 2 龄幼虫中的差异不显著，且进入滞育后至 10 月的滞育维持期间一直维持平稳水平；而 JH 合成途径限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因 *SmHMGR* 在滞育诱导和维持中表达变化与 JH 滴度及其信号传导途径相关基因 *SmMet* 和 *SmKr-h*1（李英梅等, 2006；刘禹含等, 2019；Cheng *et al.*, 2020）完全一致。因此认为，是 JH 合成而不是降解途径对麦红吸浆虫滞育诱导过程中 JH 滴度起主要调节作用。类似结果也在蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides*（Schafellner *et al.*, 2008）和大猿叶甲 *C. bowringi*（Zhu *et al.*, 2017）滞育研究中发现。有趣的是，小麦吸浆虫滞育后静息阶段的当年 12 月至翌年 1 月，*SmJHE* 和 *SmJHEH* 的表达水平均为滞育进程中的最低，而此时 JH 滴度达到最高（李英梅等, 2006；Cheng *et al.*, 2020），说明二者表达水平的降低利于 JH 的累积，从而使虫体维持静息状态。

众所周知，全变态类昆虫末龄幼虫 JH 滴度显著降低、蜕皮激素（molting hormone, MH）滴度急剧升高时引起变态（Bhaskaran *et al.*, 1986；Kinjoh *et al.*, 2007；Ureña *et al.*, 2016；Kayukawa *et al.*, 2017），而在此过程中 JH 降解酶扮演着重要角色。例如，黄斑星天牛 *P. hilaris* 5 龄幼虫变态发育过程中 JHE 活性与 JH 滴度变化呈明显的负相关，化蛹前 JH 滴度降到最低而 JHE 活性达到最高（Munyiri and Ishikawa , 2004）；苜蓿夜蛾 *Heliothis dipsacea*

*JHE* 在预蛹中的表达量显著高于其他阶段(张欢等, 2015);家蚕 *JHE* 基因敲除后末龄幼虫期延长,化蛹推迟(Zhang *et al.*, 2017)。本研究中,小麦吸浆虫 3 龄后期 *SmJHE* 表达量逐渐升高,预蛹期达到最高(图 4: A),而此时 MH 滴度显著升高,JH 信号传导相关基因 *SmMet* 和 *SmKr-h*1 表达量明显降低(成卫宁等, 2009; Cheng *et al.*, 2020),说明高水平的 *SmJHE* 表达刺激酶活性提高,促进 JH 降解,利于幼虫到蛹的变态。然而与 *SmJHE* 不同,*SmJHEH* 在预蛹期的表达量反而降到最低(图 4: B),说明在幼虫变态过程中,该酶对 JH 的降解贡献不大。

有研究表明,JH 对昆虫生殖活动的调控与 JHE 有关。例如,烟粉虱 *B. tabaci* 和西方蜜蜂 *A. mellifera* 生活史中卵黄原蛋白基因和 *JHE* 基因表达水平一致,二者均与 JH 滴度呈负相关(Mackert *et al.*, 2008; 龙楚云等, 2013)。本研究中 *SmJHE* 在雌成虫中表达量显著低于雄成虫,与 JH 信号传导相关基因 *SmMet* 和 *SmKr-h*1 表达呈负相关(Cheng *et al.*, 2020),据此推测该基因可能参与小麦吸浆虫生殖力的调控。

综上所述,*SmJHE* 和 *SmJHEH* 参与小麦吸浆虫的滞育调控,二者在滞育进程中表达量的降低为滞育后静息阶段 JH 的累计提供了保障;*SmJHE* 在发育过程中表达量的升高可能参与了幼虫到蛹的变态,在雌成虫中表达量低于雄成虫可能与 JH 调控的生殖发育有关。这说明 *SmJHE* 不仅在小麦吸浆虫滞育后静息状态维持,而且在其变态发育和生殖中均发挥作用。

## 参考文献(References)

Ayoade O, Morooka S, Tojo S, 1999. Enhancement of short wing formation and ovarian growth in the genetically defined macropterous strain of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 45(1): 93 – 100.

Bhaskaran G, Sparagana SP, Barrera P, Dahm KH, 1986. Change in corpus allatum function during metamorphosis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: regulation at the terminal step in juvenile hormone biosynthesis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 3(4): 321 – 338.

Cheng WN, Li JJ, Li YP, Li XL, Wu JX, Wang HL, 2009. Quantitative analysis of ecdysteroid in adults and the pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* Gehin. *Acta Phytophy. Sin.*, 36(2): 163 – 167. [成卫宁, 李建军, 李怡萍, 李修炼, 仵均祥, 王洪亮, 2009. 麦红吸浆虫成虫和幼虫滞育过程中蜕皮激素的定量分析. 植物保护学报, 36(2): 163 – 167]

Cheng WN, Li XJ, Zhao JJ, Zhu-Salzman K, 2020. Cloning and characterization of methoprene-tolerant (Met) and Krüppel homolog 1 (Kr-h1) genes in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*. *Insect Sci.*, 27(2): 292 – 303.

Cheng WN, Long ZR, Zhang YD, Liang TT, Zhu-Salzman Y, 2017. Effects of temperature, soil moisture and photoperiod on diapause termination and post-diapause development of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae). *J. Insect Physiol.*, 103: 78 – 85.

EI-Sheikh EA, Kamita SG, Hammock BD, 2016. Effect of juvenile hormone (JH) analog insecticides on larval development and JH esterase activity in two spodopterans. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 128: 30 – 36.

Eizaguirre M, Prats J, Abellana M, López C, Llovera M, Canela R, 1998. Juvenile hormone and diapause in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.*, 44(5): 419 – 425.

Eizaguirre M, Schafellner C, López C, Sehnal F, 2005. Relationship between an increase of juvenile hormone titer in early instars and the induction of diapause in fully grown larvae of *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.*, 51(10): 1127 – 1134.

Gagne RJ, Doane JF, 1999. The larval instars of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 101(1): 57 – 63.

Halarnkar PP, Jackson GP, Straub KM, Schooley DA, 1993. Juvenile hormone catabolism in *Manduca sexta*: homologue selectivity of catabolism and identification of a diol-phosphate conjugate as a major end product. *Experientia*, 49(11): 988 – 994.

Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, 2011. Juvenile hormone changes associated with diapause induction, maintenance, and termination in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(3): 134 – 144.

Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 181 – 204.

Kamita SG, Hammock BD, 2010. Juvenile hormone esterase: biochemistry and structure. *J. Pestic. Sci.*, 35(3): 265 – 274.

Kayukawa T, Jouraku A, Ito Y, Shinoda T, 2017. Molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of precocious larval-adult metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(5): 1057 – 1062.

Kinjoh T, Kaneko Y, Itoyama K, Mita K, Hiruma K, Shinoda T, 2007. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(8): 808 – 818.

Li S, Jiang RJ, Cao MX, 2004. Metabolism of juvenile hormone. *Acta Entomol. Sin.*, 47(3): 389 – 393. [李胜, 蒋容静, 曹梅讯, 2004. 保幼激素的代谢. 昆虫学报, 47(3): 389 – 393]

Li YM, Wu JX, Cheng WN, Li YP, Hou JJ, 2006. Determination of juvenile hormone in wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin). *Acta Agric. Bor.-occid. Sin.*, 15(4): 73 – 75. [李英

梅，仵均祥，成卫宁，李怡萍，侯娟娟，2006. 麦红吸浆虫保幼激素含量测定. 西北农业学报，15(4)：73 –75]

Liu W, Li Y, Zhu L, Zhu F, Lei CL, Wang XP, 2016. Juvenile hormone facilitates the antagonism between adult reproduction and diapause through the methoprene-tolerant gene in the female *Colaphellus bowringi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 74: 50 –60.

Liu Y, Gao H, Li XJ, Wu JX, Cheng WN, Zhu KY, 2016. Changes in sorbitol content and the expression level of sorbitol dehydrogenase gene in *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages. *Acta Entomol. Sin.*, 59(2): 119 – 126. [刘洋，高贺，李雪娇，仵均祥，成卫宁，朱克岩，2016. 麦红吸浆虫幼虫不同滞育时期体内山梨醇含量及山梨醇脱氢酶基因表达水平变化. 昆虫学报，59(2)：119 –126]

Liu YH, Liang TT, Zhao JJ, Cheng WN, Zhu KY, 2019. Cloning and expression dynamics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene *SmHMGR* during diapause and metamorphosis in *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). *Acta Entomol. Sin.*, 62(10): 1140 – 1149. [刘禹含，梁婷婷，赵佳佳，成卫宁，朱克岩，2019. 麦红吸浆虫 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因 *SmHMGR* 的克隆及在滞育与发育变态过程中的表达动态. 昆虫学报，62(10)：1140 –1149]

Long CY, Guo JY, Wan FH, 2013. Molecular cloning, sequence analysis and developmental expression of cDNA fragment of juvenile hormone esterase from the white *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(3): 234 –242. [龙楚云，郭建洋，万方浩，2013. 烟粉虱 MED 隐种保幼激素酯酶 cDNA 片段克隆、序列分析及在不同发育阶段的表达. 昆虫学报，56(3)：234 –242]

Lü FG, Fu KY, Guo WC, Li GQ, 2015. Characterization of two juvenile hormone epoxide hydrolases by RNA interference in the Colorado potato beetle. *Gene*, 570(2): 264 –271.

Mackert A, do Nascimento AM, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP, 2008. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. – Expression analysis and functional assays. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 150(1): 33 –44.

Mackert A, Hartfelder K, Bitondi MMG, Simões ZLP, 2010. The juvenile hormone (JH) epoxide hydrolase genes in the honey bee (*Apis mellifera*) genome encodes a protein which has negligible participation in JH degradation. *J. Insect Physiol.*, 56(9): 1139 – 1146.

Miao J, Wu YQ, Gong ZJ, He YZ, He YD, Duan Y, Jiang YL, 2013. Long-distance wind-borne dispersal of *Sitodiplosis mosellana* Géhin (Diptera: Cecidomyiidae) in northern China. *J. Insect Behav.*, 26(1): 120 –129.

Munyiri FN, Ishikawa Y, 2004. Endocrine changes associated with metamorphosis and diapauses induction in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothea hilaris*. *J. Insect Physiol.*, 50(11): 1075 –1081.

Riddiford LM, 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *Gen. Comp. Endocr.*, 179(3): 477 –484.

Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK, Shen Y, 2010. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 137(7): 1117 –1126.

Roy S, Saha TT, Zou Z, Raikhel AS, 2018. Regulatory pathways controlling female insect reproduction. *Annu. Rev. Entomol.*, 63: 489 –511.

Schafellner C, Eizaguirre M, López C, Sehnal F, 2008. Juvenile hormone esterase activity in the pupating and diapausing larvae of *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.*, 54(6): 916 –921.

Shrestha G, Reddy GVP, 2019. Field efficacy of insect pathogen, botanical, and jasmonic acid for the management of wheat midge *Sitodiplosis mosellana* and the impact on adult parasitoid *Macroglenes penetrans* populations in spring wheat. *Insect Sci.*, 26(3): 523 – 535.

Sieber R, Benz G, 1977. Juvenile hormone in larval diapause of the codling moth, *Laspeyresia pomonella* L. (Lepidopterae, Tortricidae). *Experientia*, 33(12): 1598 –1599.

Smykal V, Bajgar A, Provaznik J, Fexova S, Buricova M, Takaki K, Hodkova M, Jindra M, Dolezel D, 2014. Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 45(1): 69 –76.

Tsubota T, Nakakura T, Shiotsuki T, 2010. Molecular characterization and enzymatic analysis of juvenile hormone epoxide hydrolase genes in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol. Biol.*, 19(3): 399 –408.

Ureña E, Chafino S, Manjón C, Franch-Marro X, Martín D, 2016. The occurrence of the holometabolous pupal stage requires the interaction between E93, Krüppel-homolog 1 and broad-complex. *PLoS Genetics*, 12(5): e1006020.

Vermunt AMW, Koopmanschap AB, Vlak JM, de Kort CAD, 1997. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(11): 919 –928.

Wang Y, Long ZR, Feng AR, Cheng WN, 2015. Effect of initial population number, wheat varieties and precipitation on infestation of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). *Acta Agric. Bor. -occid. Sin.*, 24(10): 165 –171. [王越，龙治任，冯安荣，成卫宁，2015. 虫口基数、小麦品种和降水对小麦吸浆虫危害程度的影响. 西北农业学报，24(10)：165 –171]

Ward VK, Bonning BC, Huang T, Shiotsuki T, Griffeth VN, Hammock BD, 1992. Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. *Int. J. Biochem.*, 24(12): 1933 –1941.

Wogulis M, Wheelock CE, Kamita SG, Hinton AC, Whetstone PA, Hammock BD, Wilson DK, 2006. Structural studies of a potent insect maturation inhibitor bound to the juvenile hormone esterase of *Manduca sexta*. *Biochemistry*, 45(13): 4045 –4057.

Wu YQ, Miao J, Duan Y, Jiang YL, Gong ZJ, 2011. Research and Control of Orange Wheat Blossom Midge. Science Press, Beijing. 14 –15. [武予清，苗进，段云，蒋月丽，巩中军，2011. 小麦吸浆虫的研究与防治. 北京：科学出版社. 14 –15]

Xu SP, Zhang S, Lü LM, Luo JY, Wang CY, Li CH, Cui JJ, Lei CL,

2014. Clone and expression analysis of *Aphis gossypii* Glover juvenile hormone epoxide hydrolase gene. *Cotton Sci.*, 26(4): 326 – 333. [徐素平, 张帅, 吕丽敏, 雒珺瑜, 王春义, 李春花, 崔金杰, 雷朝亮, 2014. 棉蚜保幼激素环氧水解酶基因克隆及表达初步分析. 棉花学报, 26(4): 326 – 333]

Yagi S, Akaike N, 1976. Regulation of larval diapause by juvenile hormone in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.*, 22(3): 389 – 392.

Yang WJ, Shen GM, Dou W, Wang JJ, 2010. Research progress of insect juvenile hormone esterase. In: Wu KM ed. Public Plant Protection and Green Prevention and Control. The 2010 Academic Conference of China Society of Plant Protection, Hebi, Henan, October 28 – 31, 2010. 364 – 369. [杨文佳, 申光茂, 豆威, 王进军, 2010. 昆虫保幼激素酯酶的研究进展. 见: 吴孔明 主编. 公共植保与绿色防控. 中国植物保护学会2010 年学术年会, 河南鹤壁, 2010 年 10 月 28 – 31 日. 364 – 369]

Yin CM, Chippendale GM, 1973. Juvenile hormone regulation of the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *J. Insect Physiol.*, 19(12): 2403 – 2420.

Zhang H, Guo BZ, Fan D, 2015. cDNA cloning, sequence analysis and expression of JHE gene in *Heliothis viriplaca*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(1): 143 – 152. [张欢, 郭博智, 樊东, 2015. 苜蓿夜蛾保幼激素酯酶 cDNA 的克隆、序列分析及表达研究. 应用昆虫学报, 52(1): 143 – 152]

Zhang QR, Xu WH, Chen FS, Li S, 2005. Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(2): 153 – 164.

Zhang ZJ, Liu XJ, Shiotsuki T, Wang ZS, Xu X, Huang YP, Li MW, Li K, Tan AJ, 2017. Depletion of juvenile hormone esterase extends larval growth in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 81: 72 – 79.

Zhao J, Zhou Y, Li X, Cai WL, Hua H, 2017. Silencing of juvenile hormone epoxide hydrolase gene (*Nljheh*) enhances short wing formation in a macropterous strain of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 102: 18 – 26.

Zhu F, Li H, Wang Y, Wang XP, Zhou XM, Huang W, Lei CL, 2008. Change of trehalose, glycogen and polyol contents of the diapausing larvae of *Mylabris phalerata* (Pallas) (Coleoptera: Meloidae) at different diapausing stages. *Acta Entomol. Sin.*, 51(1): 9 – 13. [朱芬, 李红, 王永, 王小平, 周兴苗, 黄文, 雷朝亮, 2008. 大斑芫菁滞育幼虫在滞育不同阶段体内糖类和醇类含量的变化. 昆虫学报, 51(1): 9 – 13]

Zhu L, Yin TY, Sun D, Liu W, Zhu F, Lei CL, Wang XP, 2017. Juvenile hormone regulates the differential expression of putative juvenile hormone esterases via methoprene-tolerant in non-diapause-destined and diapause-destined adult female beetle. *Gene*, 627: 373 – 378.

(责任编辑: 马丽萍)